

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-356501

(P2002-356501A)

(43) 公開日 平成14年12月13日 (2002. 12. 13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08	Z 4 C 0 7 6
A 6 1 K 7/00		A 6 1 K 7/00	J 4 C 0 8 3
7/48		7/48	4 C 0 9 0
47/36		47/36	

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2002-80019 (P2002-80019)	(71) 出願人	000002071 チッソ株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号
(22) 出願日	平成14年3月22日 (2002. 3. 22)	(71) 出願人	594173175 由井 伸彦 石川県能美郡辰口町松が岡4-103
(31) 優先権主張番号	特願2001-100427 (P2001-100427)	(72) 発明者	由井 伸彦 石川県能美郡辰口町松が岡4-103
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001. 3. 30)	(72) 発明者	大谷 亨 石川県石川郡鶴来町明島町夕108-1
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100091731 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学修飾ヒアルロン酸またはその塩、およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 新規な化学修飾ヒアルロン酸またはその塩およびその製造方法を提供する。

【解決手段】 ヒアルロン酸またはその塩と、カチオン性化合物との複合体を、非水系溶媒中で、O-アシル化、アルコキシ化または架橋化する。非水系溶媒としては、クロロホルム、トルエン、塩化メチレンまたはヘプタンから選ばれた1種以上の溶媒が用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸またはその塩と、カチオン性化合物との複合体を、非水系溶媒中で、 O -アシル化、アルコキシ化または架橋化して得られる化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項2】 カチオン性化合物が第4級アンモニウム塩である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項3】 非水系溶媒がクロロホルム、トルエン、塩化メチレンまたはヘプタンから選ばれた1種以上の溶媒である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項4】 非水系溶媒中で O -アシル化、アルコキシ化または架橋化することにより発熱性物質および抗原性物質が低減されている請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項5】 発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として 0.05 EU/mg 以下である請求項4記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項6】 O -アシル化反応が、鉱酸、有機酸およびルイス (Lewis) 酸から選ばれた1種以上の酸触媒を用いる有機酸との反応、 N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド、2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージドおよび N, N' -カルボニルジイミダゾールから選ばれた1種以上の脱水剤を用いる有機酸との反応、または酸結合剤の存在下での酸無水物または酸ハロゲン化物を用いる O -アシル化である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項7】 アルコキシ化反応が、酸結合剤の存在下でのハロゲン化アルキルもしくはアルコキシドを用いるアルコキシ化反応、またはブロンステッド酸、ルイス (Lewis) 酸を酸触媒とするヒドロキシル基間の脱水反応によるアルコキシ化反応である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項8】 架橋化反応が、光反応性の官能基を導入した化学修飾ヒアルロン酸またはその塩に所定の波長の光を照射する架橋化である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項9】 架橋化反応が、多官能性アルデヒド、多官能性エポキシ化合物、および多価アルコールから選ばれた1種以上を架橋剤として用いる架橋化反応である請求項1記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【請求項10】 ヒアルロン酸またはその塩と、カチオン性化合物との複合体を非水系溶媒中で、 O -アシル化、アルコキシ化、または架橋化することの特徴とする化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項11】 カチオン性化合物が第4級アンモニウム塩である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項12】 非水系溶媒がクロロホルム、トルエ

ン、塩化メチレンまたはヘプタンから選ばれた1種以上の溶媒である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項13】 非水系溶媒中で O -アシル化、アルコキシ化または架橋化することにより発熱性物質および抗原性物質を低減させる請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項14】 発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として 0.05 EU/mg 以下である請求項13記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項15】 O -アシル化反応が、鉱酸、有機酸、およびルイス (Lewis) 酸から選ばれた1種以上の酸触媒を用いる有機酸との反応、 N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド、2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド、および N, N' -カルボニルジイミダゾールから選ばれた1種以上の脱水剤を用いる有機酸との反応、または酸結合剤の存在下での酸無水物または酸ハロゲン化物を用いる O -アシル化である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項16】 アルコキシ化反応が、酸結合剤の存在下でのハロゲン化アルキルもしくはアルコキシドを用いるアルコキシ化反応、またはブロンステッド酸、ルイス (Lewis) 酸を酸触媒とするヒドロキシル基間の脱水反応によるアルコキシ化反応である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項17】 架橋化反応が、光反応性の官能基を導入した化学修飾ヒアルロン酸またはその塩に所定の波長の光を照射する架橋化である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項18】 架橋化反応が、多官能性アルデヒド、多官能性エポキシ化合物、および多価アルコールから選ばれた1種以上を架橋剤として用いる架橋化反応である請求項10記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

【請求項19】 化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造において、ヒアルロン酸またはその塩とカチオン性化合物との複合体の O -アシル化、アルコキシ化または架橋化を非水系溶媒中で実施することの特徴とする、修飾ヒアルロン酸またはその塩中の発熱性物質および抗原性物質を低減させる方法。

【請求項20】 発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として 0.05 EU/mg 以下である請求項19記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は化学修飾されたヒアルロン酸またはその塩、およびその製造方法に関する。詳細には、ヒアルロン酸またはその塩とカチオン性化合物との複合体を、非水系溶媒中で O -アシル化、アルコキシ化または架橋化して得られる化学修飾ヒアルロン酸

またはその塩、およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸はN-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸が交互に結合してできた直鎖状の高分子多糖であり、多数の遊離カルボキシル基と多数の遊離ヒドロキシル基を有するために水に対する親和性に富み、任意の量の水に溶けて高粘度の水溶液を形成する。この遊離カルボキシル基と遊離ヒドロキシル基を封鎖することにより物性の異なるヒアルロン酸を入手することが期待される。そのために、医療、食品、化粧品分野などに使用することを目的として、ヒアルロン酸またはその塩（以下「ヒアルロン酸（塩）」と記述する）の化学修飾が行なわれているが、これまでは、水系溶媒または親水性有機溶媒中で反応を行ってきた（特開平7-309902号公報、特開平8-53501号公報）。しかしながら、従来の何れの反応も水分子の存在する系での反応であるため、ヒアルロン酸（塩）の化学修飾に適用しうる有機反応が制限されていた。また、水系の反応では、製造中に発生する水酸ラジカル等の活性酸素によりヒアルロン酸（塩）の解重合反応が起こり、ヒアルロン酸（塩）の分子量が低下する。その結果、その高分子量に由来する優れた保湿性、高粘性等のヒアルロン酸（塩）本来の特性が損なわれるという問題があった。さらに、水系の反応では、水および／または原料のヒアルロン酸（塩）自体に由来する発熱性物質および抗原性物質が混入または発生するという問題が生じる。このため、原料および／または産物の化学修飾ヒアルロン酸（塩）中の発熱性物質および抗原性物質を除去することが必要であると共に、製造工程中における発熱性物質および抗原性物質の混入を防止するよう細心の注意を払う必要があった（特表平11-512778公報）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、水分子の不存在下にて化学修飾した修飾ヒアルロン酸（塩）およびその製造方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは先述の課題に鑑み鋭意研究を重ねた結果、ヒアルロン酸（塩）とカチオン性化合物との複合体を非水系溶媒に溶解し、次いで当該複合体をO-アシル化反応、アルコキシ化反応または架橋化反応に供することにより、得られる化学修飾ヒアルロン酸（塩）の分子量低下が抑制され、ヒアルロン酸（塩）本来の保湿性、高粘性と云った特性が損なわれ難いことを見出した。さらに、発熱物質や抗原物質の最終生成物への混入が大幅に低減されることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成させた。

【0005】故に、本発明の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩は、以下の（1）～（9）に記載された構成を有する：

（1）ヒアルロン酸またはその塩と、カチオン性化合物

との複合体を、非水系溶媒中でO-アシル化、アルコキシ化または架橋化して得られる化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（2）カチオン性化合物が第4級アンモニウム塩である前記（1）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（3）非水系溶媒がクロロホルム、トルエン、塩化メチレンまたはヘプタンから選ばれた1種以上の溶媒である前記（1）の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（4）非水系溶媒中でO-アシル化、アルコキシ化または架橋化することにより発熱性物質および抗原性物質が低減されている前記（1）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（5）発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として0.05 EU/mg以下である前記（4）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【0006】（6）O-アシル化反応が、鉱酸、有機酸、およびルイス（Lewis）酸から選ばれた1種以上の酸触媒を用いる有機酸との反応、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨウジド、およびN,N'-カルボニルジイミダゾールから選ばれた1種以上の脱水剤を用いる有機酸との反応、または酸結合剤の存在下での酸無水物または酸ハロゲン化物を用いるO-アシル化である前記（1）の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（7）アルコキシ化反応が、酸結合剤の存在下でのハロゲン化アルキルもしくはアルコキシドを用いるアルコキシ化反応、またはブロンステッド酸、ルイス（Lewis）酸を酸触媒とするヒドロキシル基間の脱水反応によるアルコキシ化反応である前記（1）の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（8）架橋化反応が、光反応性の官能基を導入した化学修飾ヒアルロン酸またはその塩に所定の波長の光を照射する架橋化である前記（1）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

（9）架橋化反応が、多官能性アルデヒド、多官能性エポキシ化合物、および多価アルコールから選ばれた1種以上を架橋剤として用いる架橋化である前記（1）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩。

【0007】また、本発明の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法は、以下の（10）～（18）に記載された構成を有する：

（10）ヒアルロン酸またはその塩と、カチオン性化合物との複合体を非水系溶媒中で、O-アシル化、アルコキシ化または架橋化することの特徴とする化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

（11）カチオン性化合物が第4級アンモニウム塩である前記（10）記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

（12）非水系溶媒がクロロホルム、トルエン、塩化メチレンまたはヘプタンから選ばれた1種以上の溶媒であ

る前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(13) 非水系溶媒中でO-アシル化、アルコキシ化または架橋化することにより発熱性物質および抗原性物質を低減させる前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(14) 発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として0.05EU/mg以下である前記(13)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(15) O-アシル化反応が、鉍酸、有機酸、およびLewis酸から選ばれた1種以上の酸触媒を用いる有機酸との反応、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジミド、2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド、およびN,N'-カルボニルジイミダゾールから選ばれた1種以上の脱水剤を用いる有機酸との反応、または酸結合剤の存在下での酸無水物または酸ハロゲン化物を用いるO-アシル化である前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(16) アルコキシ化反応が、酸結合剤の存在下でのハロゲン化アルキルもしくはアルコキシドを用いるアルコキシ化反応、またはブロンステッド酸、Lewis酸を酸触媒とするヒドロキシル基間の脱水反応によるアルコキシ化反応である前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(17) 架橋化反応が、光反応性の官能基を導入した化学修飾ヒアルロン酸またはその塩に所定の波長の光を照射する架橋化である前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。

(18) 架橋化反応が、多官能性アルデヒド、多官能性エポキシ化合物、および多価アルコールから選ばれた1種以上を架橋剤として用いる架橋化で得られる前記(10)記載の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法。本発明の化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造方法は、その製造過程におけるヒアルロン酸(塩)の分解、即ち分子量低下が顕著に低減されるという特徴を有する。

【0008】さらに本発明は、修飾ヒアルロン酸またはその塩中の発熱性物質および抗原性物質を低減させる方法に関し、当該方法は以下の(19)～(20)に記載された構成を有する：

(19) 化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の製造において、ヒアルロン酸またはその塩とカチオン性化合物との複合体のO-アシル化、アルコキシ化または架橋化を非水系溶媒中で実施することを特徴とする、修飾ヒアルロン酸またはその塩中の発熱性物質および抗原性物質を低減させる方法。

(20) 発熱性物質の量が、エンドトキシン含量として0.05EU/mg以下である前記(19)記載の方法。

【0009】本発明は、本発明の化学修飾ヒアルロン酸の製造方法により製造された化学修飾ヒアルロン酸また

はその塩を用いる、医薬、化粧品または食品の製造のための化学修飾ヒアルロン酸またはその塩の使用に関する。特に、本発明により得られる化学修飾ヒアルロン酸またはその塩、好ましくは医薬上許容され得る塩は、担体、徐放剤などとして有用である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明に使用するヒアルロン酸(塩)の起源は特に限定されるものではなく、鶏の鶏冠など各種動物組織由来であっても、ヒアルロン酸(塩)の生産能を有する微生物由来であってもよいが、本発明に使用するヒアルロン酸(塩)は微生物由来であることが好ましい。ヒアルロン酸生産能を有する微生物として例えばストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エクイシミリリス(*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・エクイ(*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・デイスガラクテイエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ゾーエビデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)などを挙げるができる。

【0011】また、本発明において原料として使用するヒアルロン酸(塩)はHPLC法により測定される平均分子量が、少なくとも1万以上、好ましくは10万以上、より好ましくは50万から150万である。該HPLCによる平均分子量の測定には、多糖類の分子量測定に適する任意のカラムを用いることができるが、例えばShodex Ionpak KS806およびIonpak KS-G等のカラムを用いることが好ましい。この場合、溶出液としては0.2mol/Lの塩化ナトリウム水溶液を用い、流速1.0ml/分で流し、ヒアルロン酸(塩)の検出は206nmで行うことができる。平均分子量は分子量既知のヒアルロン酸ナトリウムで作製した検量線より計算できる。

【0012】本発明において用いるカチオン性化合物は、具体的には第4級アンモニウム塩、アミノ基を2個以上有するアミノ酸、ペプチド、ポリアミノ酸の塩、およびアミノ基を有する糖質の塩などを挙げることができ、好ましくは第4級アンモニウム塩である。

【0013】第4級アンモニウム塩としては、アルキル基のうちの少なくとも1個が炭素数8個以上からなるものが使用できる。具体的には、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド(*Distearyldimethylammonium Chloride*)、ジオレイルジメチルアンモニウムクロライド(*Dioleyldimethylammonium Chloride*)、セチルピリジニウムクロライド(*Cetylpyridinium Chloride*)、セチルトリメチルアンモニウムクロライド(*Cetyltrimethylammonium Chloride*)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(*Cetyltrimethylammonium Bromide*)、ジテトラデシルジメチルアンモニウムブロミド(*Ditetradecyldimethylammonium Bromide*)、ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(*Didodecyldimethylammonium Bromide*)、ジデシルジメチルアンモニウムブロミド(*Didecyl*

ylidimethylammonium Bromide)、オクタデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Octadecyltrimethylammonium Chloride)、ノルマルオクタデシルトリメチルアンモニウムブロミド (*n*-Octadecyltrimethylammonium Bromide)、トリドデシルメチルアンモニウムクロライド (Tridodecylmethylammonium Chloride)、トリオクチルメチルアンモニウムブロミド (Trioctylmethylammonium Bromide)、ジオクタノイル α -アルファーフォスファチジルコリン (Diocanoyl α -Phosphatidylcholine)、ジラウロイル α -アルファーフォスファチジルコリン (Dilauroyl α -Phosphatidylcholine)、ジパルミトイル D, α -アルファーフォスファチジルコリン (Dipalmitoyl D, α -Phosphatidylcholine)、1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium Propane)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium Propane)、1,2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium Propane)、1,2-ジステアロイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (1,2-Distearoyl-3-Trimethylammonium Propane)、ベンザルコニウムクロライド (Benzalkonium Chloride)、ベンゼトニウムクロライド (Benzethonium Chloride)などを挙げることができる。

【0014】ヒアルロン酸(塩)とカチオン性化合物との複合体とはヒアルロン酸のアニオン性部位(カルボキシル基)とカチオン性化合物がイオニックに結合したものをいう。その調製法の一例を以下に説明する。

【0015】＜ヒアルロン酸(塩)とカチオン性化合物との複合体の調製法＞A) ヒアルロン酸(塩)を蒸留水またはこれに相当する純水に0.01~10%の濃度、好ましくは0.05~1%の濃度にて溶解する。なお、本発明において、蒸留水に相当する純水とは、例えば、連続イオン交換(Electric Deionization)および逆浸透(Reverse Osmosis)等により精製した水を意味する。

B) 一方、ヒアルロン酸(塩)と複合体を形成させるカチオン性化合物、好ましくは第4級アンモニウム塩を蒸留水または純水に添加均一に分散させる。

【0016】B)で調製したカチオン性化合物の水溶液中のカチオン基:A)で調製したヒアルロン酸(塩)の水溶液中のカルボキシル基のモル比が、0.5~5:1、好ましくは0.7~1.5:1、例えば1:1になるように2つの水溶液を混合する。

【0017】なお、混合する際の温度は室温でも良いが、好ましくは使用するカチオン性化合物のゲル-液晶転移温度以上に両液を加温して行う。

【0018】混合により発生した水不溶物は通常化学実験で使用する分離法、例えば遠心分離、吸引ろ過、加圧

ろ過等の方法にて混合液より回収する。回収した水不溶物は、当該カチオン性化合物のゲル-液晶転移温度以上に加温した蒸留水または純水にて洗浄した後、乾燥に供する。乾燥は、通常化学実験で使用する乾燥手段、例えば常圧乾燥、真空乾燥、凍結乾燥等により行うことができる。

【0019】また、本発明において使用しうる非水系溶媒の例には、クロロホルム、塩化メチレン、トルエン、ヘプタン、エタノール、メタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、DMF、DMSO、THF等、またはこれらの2種以上の混合溶媒が包含される。クロロホルム、塩化メチレン、トルエンもしくはヘプタン、またはこれらの混合溶媒が好ましい。非水系溶媒に溶解させるヒアルロン酸(塩)とカチオン性化合物の複合体の濃度は、特に限定するものではないが、1~1000mmol/Lの範囲であることが好ましい。

【0020】該複合体の非水系溶媒への溶解後に行うO-アシル化反応としては、(1) 鉱酸(例えば、塩酸、硫酸)、有機酸(例えば、芳香族スルホン酸)、ルイス(Lewis)酸(フッ化ホウ素エーテラート)等の酸触媒を用いる有機酸との反応、(2) N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド、N,N'-カルボニルジイミダゾール等の脱水剤を用いる有機酸との反応、(3) 酸結合剤として酢酸ナトリウム、トリエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどの存在下、酸無水物または酸ハロゲン化物を用いるO-アシル化(Schotten-Baumann法)などを挙げることができる。

【0021】例えばO-アシル化反応がアセチル化、即ちアセチル化ヒアルロン酸(塩)の製造の場合は、上述のように得られたヒアルロン酸(塩)のカチオン性化合物複合体をトルエンに溶解またはケン濁し、適量の無水酢酸とピリジンを加える。この混合物を室温下2時間攪拌して反応させ、メタノールを加えて反応を停止させる。生じるゲル状物質をろ過により単離し、メタノールで洗浄する。約50℃で真空乾燥機を用いて乾燥するとアセチル化ヒアルロン酸(塩)が得られる。

【0022】アルコキシ化反応としては(1) ハロゲン化アルキルとアルコキシドを用いる方法(Williamson反応)または(2) ブロンステッド酸、ルイス(Lewis)酸が酸触媒となるヒドロキシル基間の脱水反応を用いる方法などを挙げることができる。

【0023】例えばアルコキシ化反応がベンジル化、即ちベンジル化ヒアルロン酸(塩)の製造の場合は、上述のように得られたヒアルロン酸(塩)のカチオン性化合物複合体をトルエンに溶解しハロゲン化ベンジル、水素化ナトリウムを加える。この混合物を加熱還流する。生じるゲル状物質をろ過により単離し、ヘプタンおよび水で洗浄する。約50℃で真空乾燥機を用いて乾燥するとベンジル化ヒアルロン酸(塩)複合体が得られる。

【0024】本発明において架橋化反応は、何れの架橋化反応により実施できる。本発明において好ましい架橋化反応としては、多官能性アルデヒド(グルタルアルデヒド、テレフタルアルデヒド)、多官能性エポキシ化合物(エピクロリドリン、1,2-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)エタン、エチレングリコールジグリシジルエーテル)、または多価アルコール(エチレングリコール、プロピレングリコール)などを架橋剤とする架橋化反応、および光架橋化反応を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0025】光架橋化反応は、何れの光架橋化反応により実施できるが、光反応性の官能基を導入した化学修飾ヒアルロン酸(塩)に所定の波長の光を照射する方法が好ましい。光反応性の官能基の導入に使用しうる化合物の例には、ケイ皮酸(塩)、チミン、クマリンまたはこれらの誘導体等が含まれる。

【0026】例えば光反応基がケイ皮酸基である場合は、上述のように得られたヒアルロン酸(塩)のカチオン性化合物複合体をDMFに溶解し適量のハロゲン化ケイ皮酸とピリジンを加える。この混合物を約60℃で攪拌して反応させ、メタノールを加えて反応を停止させる。生じる沈殿をろ過により分離し、次いでメタノールで洗浄する。約50℃で真空乾燥機を用いて乾燥するとケイ皮酸化ヒアルロン酸(塩)が得られる。これをDMFまたは水に溶解させ、290nm以上の波長の紫外線を照射すると架橋化ヒアルロン酸(塩)が得られる。

【0027】本発明の化学修飾ヒアルロン酸(塩)は、従来の方法により製造されるものと比較して製造過程におけるヒアルロン酸の分子量低下が顕著に低減されている。本発明により得られる化学修飾ヒアルロン酸の平均分子量は、原料のヒアルロン酸の平均分子量および/または反応条件により異なるが、例えば原料として50万~150万の平均分子量のヒアルロン酸を用いた場合、原料の平均分子量の約20%以上、好ましくは約50%以上である。

【0028】本発明の化学修飾ヒアルロン酸(塩)の用途は特に限定されるものではないが、医薬、食品、化粧品分野などに用いられる各種材料として使用可能である。特に本発明の化学修飾ヒアルロン酸(塩)であれば、非水系での製造であるため発熱物質、抗原性物質などの混入が少なく、さらに体内で代謝されるため特に医薬分野で、例えば手術時等の保湿剤、潤滑剤、創傷被覆剤、さらにはDDS(ドラッグデリバリーシステム)材料として用いることが可能である。中でもその子宮内における分解速度が、人体(子宮)内のバイオリズムと高い相関性を示すことが期待されていることから、例えば子宮内膜症治療薬を担持する子宮内もしくは腔内埋植用製剤のデバイスとして極めて有効である。

【0029】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を詳細に説明す

る。

1. 化学修飾ヒアルロン酸(塩)の製造

実施例1 (アセチル化ヒアルロン酸の合成)

ヒアルロン酸ナトリウム(チッソ CHA、平均分子量100万、以下「CHA」と記載する)1.8gを純水300mlに溶解するとともに、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド(以下、DSCと略する)2.47gを560mlの純水にケン濁させた。両液を45℃に加温後攪拌しながら混合し、5分間攪拌を続ける。発生した錯体を遠心分離(5000rpm、室温)にて回収し、45℃の温水にて洗浄した。洗浄終了後、一夜凍結乾燥、その後50℃一夜真空乾燥した。収量3.3g、収率85%。得られたCHA-DSC錯体2.0gをトルエン30ml、無水酢酸223mg、ピリジン340mgの溶媒にケン濁後室温で2時間攪拌した。氷冷下100mlのメタノールを加えた後、発生した沈殿をろ過により回収し、メタノールで洗浄後、50℃で一夜真空乾燥した。収量0.9g。IR分析によりアセチル基が認められた。さらにNMR分析によりアセチル基の導入量はヒアルロン酸の2糖単位で1.3個であった。前記のHPLC法で測定した平均分子量は50万であった。さらに発熱性物質含量をエンドトキシン含量として生化学工業製トキシカラースystem ES-6セット、ET-2セットを用いて測定した結果、エンドトキシン含量は原料のCHAでは0.2EU/mgであるのに対し、アセチル化ヒアルロン酸では0.02EU/mgであった。

【0030】実施例2 (ケイ皮酸化ヒアルロン酸による光架橋)

ヒアルロン酸ナトリウム(チッソ CHA、平均分子量100万、以下「CHA」と記載する)1.8gを純水300mlに溶解するとともに、DSC2.47gを560mlの純水にケン濁させた。両液を45℃に加温後攪拌しながら混合し、5分間攪拌を続ける。発生した錯体を遠心分離(5000rpm、室温)にて回収し、45℃の温水にて洗浄した。洗浄終了後、一夜凍結乾燥、その後50℃一夜真空乾燥した。収量3.3g、収率85%。得られたCHA-DSC錯体928mgをDMF30mlに60℃で攪拌溶解させシナモイルクロライド1670mg、ピリジン790mgを加え60℃、2時間攪拌した。その後メタノールを150ml加えて反応を停止させる共に沈殿を発生させた。発生した沈殿をろ過により回収し、メタノールで洗浄後、50℃で一夜真空乾燥した。収量40mg。NMR分析によりケイ皮酸基の導入量はヒアルロン酸の2糖単位で1.3個であった。つづいて、得られた反応物8.5mgをDMF0.17mlに溶解させ、500Wの高圧水銀ランプにより290nm以下の波長をカットした紫外線を照射し、得られたゲル状の物質の溶媒を水に置換することで250mgのヒドロゲルを得た。

【0031】比較例1 (アセチル化ヒアルロン酸の合成)

酢酸5ml、無水酢酸20mlの混合液にヒアルロン酸(チッソ CHA、ナトリウム塩として平均分子量100万) 1.5gを添加溶解させた。その後濃硫酸を1mlゆっくり添加した。室温で60分攪拌後500mlの純水に流し込み沈殿を生成させた。生じた沈殿を遠心分離(6000rpm、室温)し、500mlの純水で2回洗浄し、50%乳酸ナトリウム水溶液2.25gと80%アセトン水溶液62.5mlの混液に攪拌しながら溶解させた。その溶解液にアセトン100mlを添加し、沈殿を得た。沈殿を遠心分離(6000rpm、4℃)して回収し、エタノールで2回洗浄した。次いで凍結乾燥後、50℃で一晩真空乾燥した。IR分析によりアセチル基が認められた。さらにNMR分析によりアセチル基の導入量はヒ

アルロン酸の2糖単位で1個であった。前記のHPLC法で測定した平均分子量は5万であった。

【0032】

【発明の効果】本発明の化学修飾ヒアルロン酸(塩)は、化学修飾反応過程におけるヒアルロン酸(塩)の分子量低下が抑制され、その平均分子量が大きいこと、保湿性、高粘性等のヒアルロン酸(塩)本来の特性を充分保持している。また、発熱性物質の含量が原料のヒアルロン酸よりも低減されている。本発明の化学修飾ヒアルロン酸(塩)の製造方法によれば、平均分子量の大きい化学修飾ヒアルロン酸(塩)を製造することができ、且つ発熱性物質の混入、産生を抑制することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 郁夫
神奈川県横浜市金沢区大川5-1 チッソ
株式会社横浜研究所内

Fターム(参考) 4C076 EE37A FF57
4C083 AD33 CC02 EE12 FF01
4C090 AA02 AA05 BA67 BB92 BB97
BD42 CA36 CA38 DA22 DA26
DA27